

論文内容要旨

The Toll-like receptor 4-activated neuroprotective microglia subpopulation survives via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and JAK2/STAT5 signaling

(TLR4 活性化神経保護的ミクログリアは GM-CSF と JAK2/STAT5 シグナル伝達を介して生存を維持する)

Neurochemistry International, 2016, in press.

主指導教員：酒井 規雄教授
(基礎生命科学部門 神経薬理学)

副指導教員：秀 道広教授
(統合健康科学部門 皮膚科学)

副指導教員：浅野 知一郎教授
(基礎生命科学部門 医化学)

神垣 真由美

(医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻)

ミクログリアは脳に定住するマクロファージであり、通常は長い突起をはりめぐらせて脳内の異常を監視するが、ひとたび障害や感染を感知すると速やかに活性化し、傷害局所へ遊走し、異物や死細胞の貪食、神経保護因子の放出を介して脳内の恒常性維持に重要な役割を果たす。しかし、長期に及ぶミクログリアの強い活性化は、炎症性サイトカインや一酸化窒素、活性酸素種などを大量に放出して慢性炎症を引き起こし、アルツハイマー病などの多くの炎症性神経疾患の病態に深く関与することが示唆されている。このようにミクログリアは神経保護と神経毒性の二つの作用を持つが、その機序には不明の点が多い。我々はこれまでに、単離したラット初代培養ミクログリアにおいて、アストロサイトから単離精製したミクログリアは48時間以内にはほぼ死滅する一方、リポ多糖類(LPS)によるToll様レセプター4(TLR4)の活性化が濃度依存的に急速な死を誘発すること、しかし、一部のミクログリアはLPS無処置群より長期間生存し続けることを報告し、LPSに対して異なる反応性を示す集団が存在する可能性を示唆してきた。通常、ミクログリアはおもにアストロサイトが供給するサイトカインに依存して生存すると考えられている。しかし、TLR4活性化を受けたミクログリアがどのような機序で生存を維持するのかは不明である。そこで今回その生存メカニズムを明らかにする目的で、まずミクログリアの生存因子であるマクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF)、M-CSF受容体のリガンドであるインターロイキン(IL)-34、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)をミクログリアが自己産生する可能性をラット初代培養ミクログリアを用いて検討した。その結果LPS処置ミクログリアにおいて顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)のmRNA発現が顕著に増加しており、さらにウエスタンブロットにおいても有意な蛋白発現の増加が確認された。一方、M-CSF、IL-34のmRNA発現はLPS処置により変化は認められなかった。さらに、LPS刺激ミクログリアの生存はGM-CSF中和抗体により、有意に抑制された。また、LPS処置後のそれぞれの受容体のmRNA発現を検討したところ、M-CSF受容体には発現変化は認められず、一方GM-CSF受容体においては α 、 βc の2つのサブユニットのうち βc の有意な発現亢進が認められた。この結果より、LPS処置ミクログリアの生存維持にはGM-CSFの自己産生、およびその受容体の発現亢進が関与する可能性が示された。

次に、GM-CSF受容体の下流シグナルであり細胞生存に関与するJAK2/STAT5系に着目し、選択的JAK2阻害薬であるNVP-BSK805を用いてミクログリア生存への影響を検討した。LPS刺激ミクログリアの生存はNVP-BSK805の前処置により有意に抑制され、さらに、ウエスタンブロットおよび免疫染色から、LPS刺激によりSTAT5のリン酸化が引き起こされることが認められた。また、このリン酸化STAT5の蛍光は核部位において強く検出されたことから、リン酸化STAT5の核内移行が示された。さらに、NVP-BSK805の前処置によりこのSTAT5リン酸化は抑制された。このことから、LPS刺激によるミクログリアの生存にはJAK2/STAT5の活性化が強く関与することが示唆された。

最後に、LPS処置により長期間生存し続けるミクログリアが神経保護的か、傷害的であるかを検討するために、トランズウェルを用いて神経とミクログリアの共培養を行った。

単独培養した神経細胞は LPS の有無に関わらず 7 日目で多くは死滅したが、ミクログリアと共培養することで神経細胞死は有意に抑制された。この神経細胞死抑制作用は LPS 処置ミクログリアにおいても認められた。一般的に LPS 刺激したミクログリアは神経傷害的であると報告されているが、この結果より LPS 処置による TLR4 活性化生存ミクログリアは神経傷害的ではなく、むしろ神経保護的な役割を担うサブポピュレーションである可能性が明らかとなった。

本研究により得られた知見は炎症時におけるミクログリアの異なる機能的集団の役割を明らかにし、ミクログリアを標的とする新しい神経疾患治療の開発の基礎につながる可能性が期待される。